

The comparative study of two extraction methods for ancient DNA: silica suspension method and ultracentrifugal concentrator method

Eun-jung Lee^{1,†,★}, Frank Maixner^{2,†}, and Albert Zink^{2,★}

¹Forensic DNA analysis Sector, Gwangju Institute of National Forensic Service, Nanosandan5-ro, 60-15, Jangseong, Korea

²Institute of Mummy Studies, EURAC research, Via A. Volta 13, 39100 Bolzano, Italy

(Received October 25, 2018; Revised March 10, 2018; Accepted March 28, 2018)

고대 유전자에 대한 두 종류의 DNA 분리 방법의 비교 연구: 실리카 현탁액 방법 및 초원심분리 농축 방법

이은정^{1,†,★}, Frank Maixner^{2,†}, and Albert Zink^{2,★}

¹유전자분석실, 광주과학수사연구소

²Institute of Mummy Studies, EURAC Research

(2017. 10. 25. 접수, 2018. 3. 10. 수정, 2018. 3. 28. 승인)

Abstract This study compared two methods for preparing ancient DNA (aDNA) for the construction of successful shotgun libraries that may be applied to massive parallel sequencing. For the comparative analysis, the DNA of prehistoric rib samples from Hungary was extracted using either a manually prepared silica suspension or the Amicon Ultracel-15 10K ultracentrifugal device (Millipore). After the extraction of the same amount of bone powder (about 150 mg) from three samples by each method, the amount of extracted double-stranded DNA and the subsequent degree of construction of the shotgun library were analyzed. The Amicon device method was rapid and easier to perform and resulted in an approximately 11-fold higher DNA recovery than that obtained using the silica suspension. The shotgun library constructed using DNA templates prepared by the Amicon device was more successful than that constructed from templates isolated using the silica suspension. The comparative study of these two aDNA extraction methods showed that the Amicon device has the advantages of saving time, process simplicity, and high efficiency.

요약: 이 연구에서는 대규모 병렬형 염기서열 분석 (massively parallel sequencing)에 적용할 샷건 라이브러리 (shotgun library)를 성공적으로 제작하기 위해 두 가지 유형의 고대 DNA (ancient DNA, aDNA) 분리 방법을 비교하였다. 헝가리 선사 시대 늑골 뼈 시료로 실리카 현탁액을 이용한 추출법과 Amicon Ultracel-15 10K 초원심 분리 장치(Millipore)를 이용한 추출법을 비교하였다. 약 150 mg의 뼈가루에서 각

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)61-399-3630 Fax : +82-(0)61-399-3639

E-mail : eunjung.lee3684@gmail.com

Phone : +39-(0)471-055-561 Fax : +39-(0)471-055-579

E-mail : albert.zink@eurac.edu

†These authors contributed equally to this paper.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

각의 방법으로 3 회 반복 추출한 후 이중 가닥 DNA (double stranded DNA, ds DNA)의 양을 측정하였다. 초원심분리 농축 방법은 실리카 현탁액을 사용하는 것보다 더 빠르고, 더 쉬운 공정이며 약 11 배 높은 DNA 회수율을 나타냈다. 또한 초원심 분리 장치로 획득한 DNA 주형은 실리카 현탁액으로 획득한 것보다 샷건 라이브러리가 훨씬 성공적으로 만들어졌다. 두 종류의 aDNA 추출 방법을 비교한 본 연구는 Amicon 장치를 사용하는 분리법이 시간의 절약, 단순한 프로세스 및 높은 효율 등의 장점을 지니고 있음을 보여주었다.

Key words: ancient DNA (aDNA), extraction, silica suspension, Amicon Ultracel-15 10K, shot gun library, massively parallel sequencing

1. 서 론

고대 유전자(ancient DNA, aDNA)는 고고학적이고 역사적인 장소 및 빙하나 동토 등에서 발견된 유골이나 미라가 된 조직 등 최소 수백년에서 최대 수만년 이상된 생물학적 시료에서 추출한 DNA를 말한다. 고대 유전자 분석은 Higuchi *et al.*¹에 의해 1980년대 초 박물관에 전시 중이던 *Equus quagga*(과가, 주서식지 남아프리카, 1883년 멸종된 얼룩말의 근연종)의 근육에서 미토콘드리아 염기서열을 분석한 것으로부터 시작되었다. 과가의 샘플에서 DNA를 추출하고 플라스미드 벡터에 클로닝하여 Sanger의 체인 터미네이션 방법²으로 229 base pairs (bp) 길이의 미토콘드리아 유전자 염기서열을 밝히었다. 그로부터 20년 후인 2000년대 초반에는 대규모 병렬 염기서열 분석법 (massively parallel sequencing)을 이용해서 시베리아에서 발견된 매머드의 염기서열 13,000,000 bp를 밝혔다.³ 과학 기술이 발전함에 따라 aDNA 분석 기법도 나날이 발전하여 과거 생명체들의 유전 정보를 더 많이 밝혀낼 수 있게 되었고,³⁻⁵ 과거와 현재 생명체들의 유전 정보를 서로 비교하여 진화의 흐름을 파악할 수 있게 되었다.

본 연구는 헝가리 고대 시료 26점에 대한 대규모 병렬 염기서열 분석을 원활히 수행하기 위해서 학계에 보고되어 있는 두 가지의 방법을 서로 비교하여, 한정된 양의 고대 시료에서 좀 더 간편한 방법으로 좀 더 많은 양의 DNA를 추출하고자 하였다. 첫번째 방법인 실리카 현탁액을 이용한 방법은 분해된 고대 시료에 일반적으로 적용되어온 aDNA 분리방법으로, 용해된 뼈나 치아의 시료에 실리카 현탁액을 넣어서 실리카와 2가 양이온 매개 상호작용으로 DNA를 분리하는 방법이다.⁶ 두번째 방법인 초원심 분리 장치를 이용한 방법은 Millipore 초원심 분리 농축 장치와

Qiagen 실리카 컬럼을 병용하는 방법이다.⁷ 동량의 뼈 가루를 대상으로 실리카 현탁액을 이용한 방법과 초원심 분리 장치를 이용한 방법을 소요 시간, 간편성, 효율성, 샷건 라이브러리(shotgun library) 생산성 등의 항목들을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

헝가리 남동부 촌드라드 주에 위치한 호드메죄바사르헤이 지역의 약 7000년전 고대 유적지에서 발굴한 시신의 늑골 조각 (3.89 g)을 대상으로 하였다(Fig. 1). 실험에 사용한 핀셋, 그라인더 디스크와 핀, 명반, 메스실린더, 비이커, 시약병 등과 같은 모든 도구들은 세척한 후 과산화수소, 멸균수 및 자외선을 순서대로 처리하였다. 늑골 시료의 표면은 오염을 줄이기 위해 그라인더(Proxxon)로 긁어 내었고, 3% 과산화수소를 발라주었으며, 늑골 조각 양쪽 면에 자외선을 각각 5



Fig. 1. The rib bone fragment (total weight is 3.89 g) from the archeological site of Hódmezővásárhely in Hungary.

분씩 처리하였다. 자외선을 처리한 뼈 조각을 그라인더를 이용하여 적당한 크기로 잘라서 그라인딩 보울(grinding bowl)에 볼(ball)과 함께 넣어 주고, Mixer Mill 400 기기(Retsch)에 진동수를 25로 설정하여 2분 갈아주었다. 뿔가루는 총 3.04 g을 얻었고, 이중 약 150 mg씩을 6 개의 15 mL 튜브에 나눠 담았다. 실리카 현탁액을 이용한 방법과 초원심 분리 장치를 이용한 방법에 각각 세개의 뿔가루 튜브를 사용하였다. 아무 것도 들어 있지 않은 깨끗한 튜브 1 개씩을 음성대조(blank)로 각각 사용하였다.

2.2. 시료 전처리

약 150 mg의 뿔가루가 담겨 있는 튜브 및 음성대조 튜브에 0.5 M EDTA를 5 mL, 0.1 M N-Laurylsarcosine을 250 μ L 넣어서 vortexer ZX3 (VELP)로 잘 섞어 주었고, 40 $^{\circ}$ C로 예열된 hybridization incubator combi-H12 (FINEPCR)에서 회전 속도 3으로 30분 동안 전처리를 하였다. 전처리한 시료를 Centrifuge 5810R (Eppendorf)에서 5000 g의 속도로 2분 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 뿔가루 침전물에 0.5 M EDTA를 5 mL, 20 mg/ml 농도의 Proteinase K를 20 μ L 넣어서 40 $^{\circ}$ C의 hybridization incubator에서 회전속도 3의 속도로 16시간 이상 용해하였다. 용해시킨 시료를 5000 g의 속도로 2분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 다음 과정에서 사용하였다.

2.3. 실리카 현탁액을 이용한 방법

이 방법은 Rohland *et al.*⁶의 방법을 약간 변형한 방법이다. 16시간 동안 용해시킨 시료의 상층액을 새로운 15 mL 튜브에 담아 10 mL의 binding buffer II (4 M Guanidine hydrochloride, 32% (vol/vol) Isopropanol, 4% Tween 20, 100 mM Sodium acetate pH 5.2)와 100 μ L의 실리카 현탁액(멸균 증류수 40 mL에 silicone dioxide 4.8 g을 넣어 침전시켜 4 mL만 남기고 30% HCl 48 μ L 섞어서 준비, 냉장보관)을 넣어서 잘 섞어주었다. 상온에서 hybridization incubator에 회전 속도 3으로 3시간 동안 두었다. 시료를 5000 g의 속도로 2분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 남아 있는 침전물에 1 mL의 binding buffer II를 넣고 vortexer로 잘 녹여서 2 mL screw cap tube에 옮겼다. 16000 g의 속도로 15초 동안 원심분리하여 상층액을 버리고, 500 μ L의 washing buffer (125 mM NaCl, 10 mM Tris base, 1 mM EDTA pH 8.0의 100 mL을 고압멸균 후 ethanol 200 mL 첨가)를 넣고 침전물을 녹이고 16000 g의 속

도로 15초 동안 원심분리하였다. 상층액을 버리고 뚜껑을 열어둔 채 1시간 30분 동안 침전물을 건조시켰다. 100 μ L의 멸균수를 넣고 vortexer로 잘 녹여서 heat block H-250 (ROTH)을 이용하여 60 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 DNA를 용출하였다. 실리콘을 screw cap 안쪽에 넣어서 16000 g의 속도로 2분 동안 원심분리하였다. 침전물은 제일 아래층에 실리카, 중간층에 실리콘, 상층에 DNA로 이루어져 있어서 상층에서 DNA를 취하였다. 추출한 DNA는 다음 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.4. 초원심 분리 장치를 이용한 방법

이 방법은 Gamba *et al.*⁷의 방법을 약간 변형한 방법이다. 16시간 동안 용해시킨 시료의 상층액을 Amicon Ultracel-15 10K 초원심 분리 장치(Millipore)에 넣어서 농축액이 100 μ L 이하로 될 때까지 2500 g에서 약 3시간 원심분리하였다.⁸ 농축액을 MinElute PCR purification kit (Qiagen)⁹의 5 배 볼륨의 PB 버퍼와 섞어준 후 MinElute column에 넣고 17900 g에서 1분 동안 원심분리하였다. 750 μ L의 PE를 넣고 17900 g에서 1분 동안 원심분리하였다. 100 μ L의 멸균 증류수를 넣고 5분 동안 용출시키고, 17900 g에서 1분 동안 원심분리하였다. 추출한 DNA는 다음 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.5. DNA 정량, 샷건 라이브러리 제작 및 확인

두가지 방법으로 분리한 DNA를 정량하기 위해서 Quantus E6150 형광측정기(PROMEGA)를 사용자 매뉴얼에 따라 이용하였다.¹⁰ 정량을 마친 후 실리카 현탁액으로 분리한 DNA 3 개와 음성대조시료 1 개, 초원심 분리 장치로 분리한 DNA 3 개와 음성대조시료 1 개 각각에서 30 μ L(주형으로 사용할 수 있는 최대 양)로 P7 indexing adapter 112~119를 이용하여 double index 방법¹¹으로 샷건 라이브러리를 제작하였다. 샷건 라이브러리 생성 여부 확인을 위해서 2100 BioAnalyzer High Sensitivity DNA kit (Agilent)¹²를 사용하였다.

3. 결 과

시간 소요 정도를 체크하기 위해 두 가지 분리 방법의 재료 및 방법에서 언급된 시간을 각각 합해 보았다. 실리카 현탁액 방법은 총 279.5분 이상이 필요하고, 초원심분리 장치를 이용한 방법은 총 187분 이상이 필요하여 실리카 현탁액 방법이 1.49 배의 시간

Table 1. The comparison of ancient DNA concentration acquired from two methods

Sample name	Sample weight (mg)	Concentration (ng/ μ L)	Sample name	Sample weight (mg)	Concentration (ng/ μ L)
Silica 1	160	0.0295	Amicon 1	160	0.567
Silica 2	150	0.0825	Amicon 2	160	0.711
Silica 3	160	0.0627	Amicon 3	150	0.660
blank	-	0.0001	blank	-	-0.0002

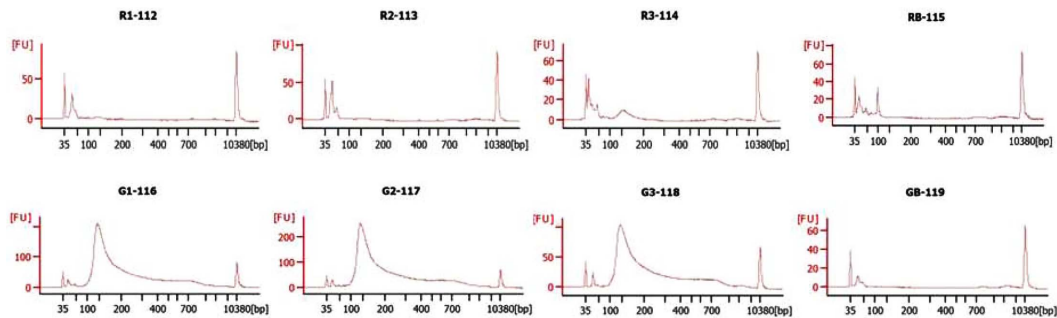


Fig. 2. Shotgun library peaks detected by Agilent 2100 BioAnalyzer. The data of R1, R2, R3 and RB were acquired from DNA templates prepared by silica suspension method. The data of G1, G2, G3 and GB were acquired from DNA templates prepared by Amicon ultracentrifugal concentrator. The number 1-3 means DNA has been separated three times and B means blank.

이 더 필요한 것으로 나타났다. 분리 자체에 소요되는 시간외에 실리카 현탁액 방법은 실험 전 binding buffer II와 실리카 현탁액을 준비하는 시간까지 더 필요하다. 뿔가루 분해를 0.5 M EDTA 3.5 mL와 20 mg/mL 농도의 Proteinase K 20 μ L로 부피를 줄이면 초원심분리 장치를 Ultracel-15에서 Ultracel-4로 대체할 수 있고, 원심 분리 시간을 3시간에서 2시간 40분으로 단축시킬 수 있었다.

분리 방법의 간편성에 있어서 분리에 필요한 시약인 binding buffer II 및 실리카 현탁액 제조, 1시간 30분 동안의 침전물 건조, 열에 의한 DNA 용출 작업, 실리콘을 추가하여 세개의 층에서 DNA 층만 취하는 작업 등이 없는 초원심분리 장치를 이용한 방법이 더 단순한 것으로 보인다.

DNA 분리의 효율성을 비교하기 위해서 Quantus로 DNA 이중가닥의 양을 측정된 결과 실리카 현탁액 방법은 평균 0.0582 ng/ μ L의 농도로 DNA가 분리되었고, 초원심분리 장치를 이용한 방법은 평균 0.646 ng/ μ L의 DNA 농도를 보였다. 초원심분리 장치를 이용한 방법이 실리카 현탁액을 이용한 방법보다 약 11배 높은 DNA 회수율을 보였다(Table 1).

샷건 라이브러리 생산성 비교를 위하여 Meyer *et al.*¹¹의 방법으로 제작한 라이브러리를 2100 BioAnalyzer

High Sensitivity DNA kit로 확인하여 보니 초원심분리 장치를 이용한 방법이 더 높은 peak를 보였다(Fig. 2). 실리카 현탁액 방법으로 분리한 DNA는 원래의 DNA 농도가 낮아서 약 10 배의 농축 과정을 거치지 않는 한 다음 실험 과정으로의 진행이 어려울 것으로 보인다.

이 비교 실험을 토대로 헝가리 7000년전 시료 25점(관자뼈 20점, 치아 3점, 두개골 1점, 종아리뼈 1점) 및 1300-1400년전 시료 1점(관자뼈) 등 총 26점을 초원심분리 장치로 DNA를 분리한 결과 최소 0.253 ng/ μ L에서 최대 1.86 ng/ μ L의 농도로 DNA가 추출이 되었다(평균 0.823 ng/ μ L). 그리고 모든 시료를 대상으로 샷건 라이브러리도 성공적으로 만들어졌다(data not shown).

초원심분리 장치 이용 방법은 초원심분리 장치 및 MinElute PCR purification kit 등의 소모품 비용을 고려해야 하는 단점이 있을 수 있다. 하지만 한정된 시료의 고대 유전자 분석에 있어서 효율성이 높은 DNA 분리 방법으로 더 많은 DNA양을 확보하는 것은 다음 실험 과정의 성공적인 진행을 위해서 꼭 필요하다.

4. 고찰

본 연구는 고대 시료로부터 효과적으로 유전자를 분리하기 위해서 시도되었다. 제작된 샷건 라이브러리

를 대규모 병렬 염기서열 분석을 실시하여 얻어진 수많은 염기서열 가닥들로부터 생물정보학적 프로그램¹³을 이용해 우리가 원하는 염기서열을 얻을 수 있다. 고유골의 경우 오염이 큰 문제가 될 수 있다. 이에 대규모 병렬 염기서열 분석법으로 얻어진 염기서열이 5' 및 3' 말단에서 cytosine이 uracil로 탈아민화가 되었는지 그 정도 (%)를 측정하므로써 그 염기서열이 고대 시료로부터 유래하였는지, 현대의 오염으로부터 유래하였는지 판단할 수 있다.¹⁴

초원심분리 장치인 Amicon Ultracel-15 10K는 molecular weight cut-off (MWCO) 값이 10,000 Da (Dalton)으로 10 kDa 이하의 물질들은 필터에서 빠져나가게 된다. 예를 들어 고대 유전자 40 bp의 DNA 이중가닥의 평균 분자량을 26 kDa으로 추정한다면 Amicon Ultracel-15 10K 필터 밖으로 빠지지 않게 된다.⁸ 이렇게 농축된 시료를 MinElute PCR purification kit로 정제를 하게 된다. MinElute 실리카 컬럼은 주로 70 bp ~ 4 kbp 크기의 DNA 가닥과 최대 5 µg까지 결합할 수 있고, 40 bp 미만의 DNA 가닥은 결합할 수 없다.⁹ 따라서 Amicon Ultracel-15 10K 및 MinElute PCR purification kit를 이용하면 40 bp 이상의 DNA 가 분리되는 것으로 추정할 수 있다.

동량의 뿔가루와 동량의 용해 시료를 가지고 실리카 현탁액을 이용하여 DNA 분리하는 과정에서 어느 단계에서 DNA 손실이 일어났는지에 대해서는 정확히 알 수 없다. 초원심분리 장치 및 MinElute PCR purification kit를 이용하면 농축 과정과 정제 과정을 거치게 되므로 DNA 분리 효율성이 높은 것으로 사료된다. 60여 년된 뼈 시료를 대상으로 DNA 추출법 비교 연구¹⁵에서 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) 내 실리카 컬럼과 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)내 PB 버퍼를 이용한 방법으로 분리한 DNA가 사람 유전자 정량화 실시간 증폭 과정이나 사람 개인 식별 STR (short tandem repeat) 증폭 과정 등에서 우세한 것으로 나타났다. 이번 본 연구에서 Qiagen의 PB 버퍼를 그들의 연구¹⁵와 공통적으로 사용하였고, 사람 유전자 정량화 실시간 증폭 과정과 사람 개인 식별 STR 증폭 과정 등으로 DNA 분리 효율성을 판단하지는 않았지만 실리카 현탁액을 이용한 방법보다 초원심분리 장치 및 MinElute PCR purification kit를 이용한 방법이 DNA 양과 샷건 라이브러리 제작에 있어서 우수하다는 결과를 얻었다.

요컨대 오랜 기간 동안 분절되어진 DNA를 지니고 있는 고대 시료의 DNA 분리에 있어서 초원심분리 장

치 및 MinElute PCR purification kit를 이용한 방법이 유용한 것으로 판단된다. 본 연구 결과를 토대로 범죄 사건 현장에서 발견되는 미량 시료 (low copy number) 나 오염된 시료의 DNA 분리에 적용해볼 만한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2015년 하반기 국외훈련 (개인훈련) 시 EURAC research에서 실험한 내용을 토대로 작성한 것임. 이 연구를 위해서 도움을 주신 이탈리아 EURAC research내 미라연구소 (Institute for Mummy studies) 에 근무하는 Albert Zink, Frank Maixner, Christina Wurst, Nail O'Sullivan에게 감사의 마음을 전함.

이 논문은 행정안전부 주관 국립과학수사연구원 중장기과학수사감정기법연구개발(R&D) 사업의 지원을 받아 수행한 연구임(2018-유전자-02).

References

1. R. Higuchi, B. Bowman, M. Freiberger, O. A. Ryder, and A. C. Wilson, *Nature*, **312**, 282-284 (1984).
2. F. Sanger, *Biosci. Rep.*, **1**(1), 3-18 (1981).
3. H. N. Poinar, C. Schwarz, J. Qi, B. Shapiro, R. D. MacPhee, B. Buigues, A. Tikhonov, D. H. Huson, L. P. Tomsho, A. Auch, M. Rampp, W. Miller, and S. C. Schuster, *Science*, **311**(5759), 392-394 (2006).
4. E. Hagelberg, M. Hofreiter, and C. Keyser, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **370**(1660), 20130371. <http://doi.org/10.1098/rstb.2013.0371> (2015).
5. M. Hofreiter, J. L. A. Pajmans, H. Goodchild, C. F. Speller, A. Barlow, G. G. Fortes, J. A. Thomas, A. Ludwig, and M. J. Collins, *BioEssays*, **37**(3), 284-293 (2015).
6. N. Rohland, M. Hofreiter, *BioTechniques*, **42**(3), 343 (2007).
7. C. Gamba, E. R. Jones, M. D. Teasdale, R. L. McLaughlin, G. Gonzalez-Fortes, V. Mattiangeli, L. Domboróczki, I. Kövári, I. Pap, A. Anders, A. Whittle, J. Dani, P. Raczky, T. F. G. Higham, M. Hofreiter, D. G. Bradley, and R. Pinhasi, *Nature Communications*, **5**, 5257 (2014).
8. Millipore User Guide Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal Filter Devices (2014).
9. Qiagen MinElute® Handbook (2008).
10. Premega Quantus Fluorometer Operating Manual

- #TM396 (2014).
11. M. Meyer and M. Kircher, *Cold Spring Harbor Protocols*, **2010**(6), pdb-prot5448 (2010).
 12. Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide (2009).
 13. www.python.org
 14. H. Jonsson, A. Ginolhac, M. Schubert, P. L. Johnson, and L. Orlando, *Bioinformatics*, **29**(13), 1682-1684 (2013).
 15. H. Y. Lee, M. J. Park, N. Y. Kim, J. E. Sim, W. I. Yang, and K. J. Shin, *Forensic Sci. Int: Genetics*, **4**, 275-280 (2010).